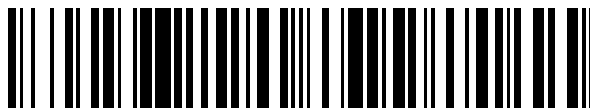


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 330**

21 Número de solicitud: 201800217

51 Int. Cl.:

**G01N 21/51** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.10.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.05.2020**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2019/070656**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (60.0%)**  
**Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n**  
**39005 Santander (Cantabria) ES;**  
**FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA**  
**(30.0%) y**  
**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN**  
**MARQUÉS DE VALDECILLA (10.0%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ CAGIGAL, Manuel;**  
**VALLE HERRERO, Pedro José;**  
**ARROYO RODRIGUEZ, José Luis y**  
**FUENTES RUIZ, Antonio**

54 Título: **Sistema y método para el recuento celular de una muestra sanguínea**

57 Resumen:

Sistema y método configurados para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, mediante la técnica de contraste de Speckle, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor (14, 24, 34).

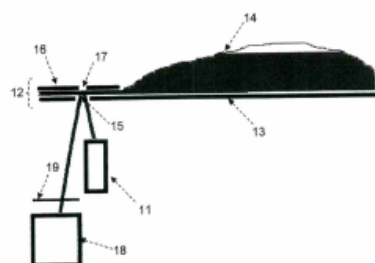


FIGURA 1

## DESCRIPCIÓN

Sistema y método para el recuento celular de una muestra sanguínea.

### 5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de los sistemas y métodos configurados para el control de la calidad de los componentes sanguíneos y, más concretamente, al de los sistemas y métodos configurados para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor, mediante la técnica *Interferometría de Speckle*.

### 15 Antecedentes de la invención

La producción de componentes sanguíneos destinados a transfusión exige la realización de controles de calidad de los productos intermedios y finales, con el fin de garantizar la calidad y seguridad de dichos componentes.

Conforme a la normativa europea vigente (DIRECTIVA 2004/33/CE DE LA COMISION de 22 de marzo de 2004 por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos), a la legislación española (RD 1088/2005) y a los estándares de las distintas asociaciones científicas relacionadas con la medicina transfusional (CAT, AABB, etc.) estos controles de calidad deben incluir, entre otros, un recuento celular específico que garantice que el componente a transfundir (concentrado de plaquetas, concentrado de hematíes) contiene células suficientes como para ejercer el efecto terapéutico deseado.

Los requisitos de control de calidad Estándares CAT 3° Ed (Comité de Acreditación Transfusión sanguínea y Terapia celular) se muestran en la siguiente tabla:

Componente sanguíneo	Parámetro	Frecuencia control	Requisito
Concentrados de hematíes	Cantidad de Hb	> 1% de la producción	43 g / U
	Hemólisis	> 1% de la producción	Hemólisis < 0.8%
Concentrados de plaquetas	Recuento de plaquetas	>1% de la producción	2.7 1011/U

Tabla 1. Requisitos de control de calidad estándares CAT 3° Ed

Aunque en la actualidad existen diferentes opciones para realizar estas medidas, en todos los casos se necesita la obtención previa de una muestra separada de cada derivado de sangre almacenado. El análisis puede estar basado en un proceso químico o en la utilización de un dispositivo óptico diseñado para este propósito. En todos los casos estos procedimientos implican una serie de inconvenientes asociados a la propia obtención de muestra (pérdida de volumen final, riesgo de contaminación, tiempo necesario) como a los propios procedimientos (tiempo de medida relativamente largo, necesidad de equipamiento caro y de gran tamaño).

El documento WO2015160418A2 hace referencia a un sistema para determinar el módulo viscoelástico de una muestra. Incluye una fuente láser, un sistema óptico de adquisición de

datos con un detector óptico configurado para recibir la radiación electromagnética difundida por las partículas y un procesador programado para determinar el tamaño de las partículas difusoras a partir del perfil de flujo radiante derivado de los datos ópticos y calcular el desplazamiento cuadrático medio (MSD) basado en la autocorrelación temporal de la intensidad. Las secuencias de Speckle adquiridas a una determinada velocidad pueden procesarse para obtener la intensidad media en una región de interés de tamaño determinado. El Índice de Polidispersión (PDI) se utiliza para cuantificar el ancho normalizado de la distribución del tamaño de la partícula difusora. La métrica se puede definir por ejemplo como  $PDI = \sigma_a / \mu_a$ ; donde  $\mu_a$  y  $\sigma_a$  son la media y la desviación estándar de la distribución del tamaño de partícula. Puede determinar además el tamaño de las partículas difusoras comparando dos mapas de valores. El primero de ellos caracteriza la distribución de la irradiancia de luz en el perfil de flujo radiante. El segundo contiene distribuciones de irradiancia de luz a través de perfiles de flujos radiantes de referencia obtenidos a partir de una variable representativa del tamaño medio de las partículas difusoras y una segunda variable representativa del cambio de índice de refracción entre las partículas y el medio que las contiene. Opcionalmente una tercera variable representativa de la longitud de onda de la fuente de luz. En una realización se utilizan predeterminados estados de polarización en la luz incidente y en la detectada. La polarización de la luz incidente puede variarse manualmente pudiendo ser paralela o perpendicular a la polarización de la luz detectada.

Sin embargo, el sistema y método descrito en esta patente no permite una medida cuantitativa de la concentración de hematíes ni de su grado de hemólisis porque se basa en la medida y el calibrado del PDI, el cual resulta útil únicamente para determinar el tamaño de las partículas difusoras, pero no para la medida de su concentración ni de la hemólisis de los concentrados de hematíes.

El documento WO2006023470A1 divulga un sistema y método para la medida óptica en contenedores sellados pudiendo detectar cultivos de sangre positivos y determinar la combinación de volumen de sangre y hematocritos que hay en el contenedor. Se dirige un rayo de luz (puede ser de láser, con longitud de onda entre 640 y 720 nm) hacia una zona de pared transparente del contenedor de manera que se desvía de la normal un cierto ángulo generando una distribución espacial asimétrica de la luz retrodifundida que se detecta al menos en parte mediante un detector que evita las porciones reflejadas por las superficies exterior e interior de la pared extrayendo características analíticas y determinando el volumen y el valor de hematocritos de la muestra del contenedor comparándolas con la información de calibración prerregistrada.

Sin embargo, en este documento se propone utilizar un contenedor específico, diseñado para tal fin, para detectar el volumen de hematocrito. El contenedor ha de permitir formar una imagen directa de su contenido para medir el volumen de llenado. Por tanto, el método no sería capaz de distinguir entre dos concentraciones diferentes que presentaran el mismo volumen de llenado del contenedor.

El documento WO2012101644A2 describe un sistema para monitorizar de manera no invasiva uno o más parámetros y condiciones de un individuo. Comprende un puerto de entrada que recibe datos de imagen medidas por un conjunto ordenado de píxeles en la forma de una secuencia de patrón de Speckle generado por una porción del cuerpo del sujeto en respuesta a su iluminación con luz coherente siguiendo un determinado patrón de tiempo de muestreo. Una memoria para almacenar modelos que incluyen la relación entre uno o más parámetros medibles y una o más condiciones del sujeto. Un procesador de los datos de imagen que determina una función de correlación espacial entre sucesivos patrones de Speckle en secuencia y determina una función de correlación espacial variante con el tiempo indicativa de la variación temporal del patrón de Speckle. Selecciona un parámetro de la función de

correlación espacial variante con el tiempo, le aplica los modelos y genera una salida indicativa de las condiciones del sujeto.

Sin embargo, este método propone una medida relativa, no absoluta. De hecho, en el documento se propone un dispositivo para medir la evolución temporal de la función de correlación espacial del Speckle producido por iluminación coherente de partes del cuerpo con movimiento natural (vibración, pulsación) que no resulta aplicable a la medida de componentes sanguíneos ni de hemólisis de hematíes en las condiciones de estabilidad de los recipientes de almacenaje y conservación.

En definitiva, en el estado de la técnica no existe ningún sistema y método sencillo, económico y capaz de determinar en tiempo real la concentración de los diferentes componentes de la sangre. Además, tampoco es posible utilizar los sistemas y métodos descritos para estimar de forma objetiva la importancia de los procesos que sufren dichos componentes durante el almacenamiento. Por tanto, sería deseable un dispositivo capaz de proporcionar valores cuantitativos de la concentración de hematíes y de su grado de hemólisis a partir de medidas directas sobre los recipientes de almacenaje que se encuentran en los bancos de sangre.

### Resumen de la invención

La presente invención trata de resolver los inconvenientes mencionados anteriormente mediante un sistema y método configurados para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, mediante la técnica de contraste de *Speckle*, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor.

El sistema comprende:

- al menos una fuente de luz coherente monocromática, tal que dicha fuente emite una luz (haz de luz incidente) cuya longitud de onda no sea absorbida por los componentes de la muestra a analizar;

- un portamuestras, que comprende a su vez:

- una superficie plana y horizontal que soporta el recipiente contenedor de la muestra en posición horizontal, con un orificio de superficie al menos del tamaño del haz de luz incidente que llega a dicha superficie, tal que el haz de luz incidente atraviese el orificio de superficie y no se produzca difracción en los bordes;

- un elemento de compresión plano y horizontal, tal que la superficie y el elemento de compresión son paralelos y tal que el elemento de compresión se encuentra en un plano superior con respecto a la superficie, con un orificio de elemento de compresión al menos del tamaño del haz de luz hacia delante proveniente de la muestra que llega a dicho elemento de compresión, donde dicho orificio de elemento de compresión se encuentra alineado con el orificio de superficie tal que la luz difundida hacia delante no rebote en el portamuestras y contribuya a la señal retrodifundida, y donde el elemento de compresión está configurado para comprimir una parte del recipiente contenedor manteniendo un volumen iluminado constante;

- al menos un elemento de control de la separación superficie — elemento de compresión; configurado para controlar la distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie y presionar el recipiente contenedor durante la realización del ensayo, de forma que el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica, de tal forma que sea posible presionar el recipiente

contenedor en cada ensayo de igual manera, independientemente de la cantidad de muestra que contiene y de las presiones internas; y tal que la distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie durante la realización del ensayo está comprendida entre los valores:

$3.10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3.10^9 / SI / N_p$  (más preferentemente entre los valores:

$3.10^6 / SI / N_p \leq e < 3.10^8 / SI / N_p$ )

donde:

$N_p$ : es la concentración (partículas por unidad de volumen) de la muestra iluminada;

$e$ : es la distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie durante la realización del ensayo, o lo que es lo mismo, el espesor de la muestra iluminada durante la realización del ensayo;

$SI$ : es la dimensión de la superficie iluminada, o lo que es lo mismo, la sección de haz de luz;

- un detector formado por un conjunto ordenado de píxeles, en cuya superficie la luz recibida forma un patrón de interferencia de *Speckle*, tal que el número de píxeles esté comprendido entre 4 y 16 píxeles por grano de *Speckle*, estando dicho detector configurado para recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie, tal que dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente;

- un analizador situado entre el recipiente contenedor de la muestra y el detector, tal que la fuente de luz coherente monocromática y el analizador presentan polarizaciones cruzadas para evitar reflexión directa.

En una posible realización, la fuente de luz coherente monocromática es un láser que emite una luz cuya longitud de onda es de 632 nm.

En una posible realización, la superficie y el elemento de compresión se encuentran unidos en sus extremos laterales formando una única pieza, y el tamaño del elemento de compresión es inferior a 1/3 el tamaño de la superficie, de forma que se comprime un volumen inferior a 1/3 del recipiente contenedor.

En una posible realización, el color de la superficie y del elemento de compresión es negro y el material lo suficientemente rígido para evitar deformaciones durante el uso.

En una posible realización, en el caso de que la fuente de luz coherente monocromática no esté polarizada, el sistema comprende además un polarizador entre la fuente de luz coherente monocromática y el recipiente contenedor de la muestra y con dirección de polarización cruzada con la del analizador.

En una posible realización, el sistema comprende además al menos un espejo configurado para: 1) recoger la luz procedente de la fuente de luz coherente monocromática y dirigir dicha luz hacia la muestra a través del orificio de superficie; y/o 2) recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie, donde dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente, y dirigirla al detector.

En una posible realización, el sistema comprende además al menos una lámina semirreflejante configurada para: 1) recoger la luz procedente de la fuente de luz coherente monocromática y

dirigir dicha luz hacia la muestra a través del orificio de superficie; y/o 2) recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie, donde dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente, y dirigirla al detector.

5 En una posible realización, el sistema comprende además una lente situada entre el orificio de superficie y el detector, configurada para recoger la señal retrodifundida y concentrar esta luz retrodifundida sobre la superficie del detector.

10 En una posible realización, el sistema comprende además un diafragma situado a la entrada del detector configurado para filtrar la señal.

En una posible realización, el elemento de compresión es una pletina.

15 En una posible realización, el sistema comprende dos elementos de control situados en el elemento de compresión a cada lado del orificio de elemento de compresión, y ambos elementos de control son topes.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor, utilizando el dispositivo definido anteriormente. El método comprende las etapas de:

25 - situar el recipiente contenedor en el portamuestras;

30 - ajustar la distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie mediante el elemento de control tal que, durante la realización del ensayo, el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica, tal que dicha distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie durante la realización del ensayo (e) está comprendida entre los valores:

$3 \cdot 10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3 \cdot 10^9 / SI / N_p$  (más preferentemente entre los valores:

35  $3 \cdot 10^6 / SI / N_p \leq e < 3 \cdot 10^8 / SI / N_p$ )

donde:

$N_p$ : es la concentración (partículas por unidad de volumen) de la muestra iluminada;

40 e: es la distancia del elemento de compresión con respecto a la superficie durante la realización del ensayo, o lo que es lo mismo, el espesor de la muestra iluminada durante la realización del ensayo;

45 SI: es la dimensión de la superficie iluminada, o lo que es lo mismo, la sección de haz de luz;

50 - dejar el recipiente contenedor en reposo (sin comenzar el ensayo) durante un tiempo de al menos 90 segundos, con el objetivo de limitar el efecto de los flujos internos en el movimiento de las partículas de forma que todo el movimiento de estas se deba al movimiento browniano térmico;

- procesar los diferentes patrones de interferencia de *Speckle* formados en la superficie del detector a lo largo de una secuencia temporal, siendo 10 el número mínimo de

patrones de interferencia de *Speckle* a procesar y siendo el tiempo de exposición utilizado para la captura de la imagen del orden del tiempo de coherencia del patrón;

- evaluar la intensidad media de cada pixel y la desviación estándar de cada pixel;

- obtener el contraste de cada pixel, como el cociente entre su desviación estándar y su intensidad media;

- obtener el contraste global, realizando un promedio de los valores de contraste de cada pixel;

- realizar al menos un calibrado del sistema a partir de datos obtenidos de un hemograma de un conjunto de muestras de control, estableciendo así una tabla de correspondencia (ejemplo: contraste global obtenido con el sistema vs concentración obtenida del hemograma);

- a partir de la tabla de correspondencia, obtener el valor del componente de la muestra buscado (por ejemplo: concentración de hematíes).

En una posible realización, la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se evalúa a lo largo de la secuencia temporal de imágenes, y el contraste obtenido para cada pixel es temporal. Alternativamente, la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se evalúa en un área en torno a dicho pixel, el contraste obtenido para cada pixel es espacial, y a continuación se promedia a lo largo de la secuencia temporal de imágenes este contraste espacial de cada pixel, obteniendo un nuevo valor de contraste espacial para cada pixel.

En una posible realización, el procesado de imágenes se realiza mediante un filtro gaussiano, configurado para eliminar los ruidos de detección. Alternativamente, el procesado de imágenes se realiza mediante un filtro laplaciano, configurado para destacar las zonas de mayor intensidad. En otra posible realización, el procesado de imágenes se realiza mediante ambos filtros.

En una posible realización, en el caso en el que existan al menos dos componentes de tamaños diferenciados en varios órdenes de magnitud, el método comprende además una etapa de procesado de las imágenes de *Speckle* con el objetivo de eliminar la señal dominante debida a los componentes de mayor tamaño (por ejemplo: hematíes) y poder analizar la señal procedente de los componentes de menor tamaño (por ejemplo: moléculas de hemoglobina). En una posible realización, el procesado de imágenes se realiza mediante la resta de dos imágenes de *Speckle* consecutivas, eliminado de esta forma la señal dominante debida a los componentes de mayor tamaño como consecuencia de su lenta evolución.

En una posible realización, el tiempo de exposición utilizado para la captura de la imagen es de aproximadamente 10 ms.

## Breve descripción de las figuras

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, y para complementar esta descripción, se acompaña como parte integrante de la misma, un juego de dibujos, cuyo carácter es ilustrativo y no limitativo. En estos dibujos:

La figura 1 muestra un esquema del sistema de la invención, de acuerdo con una posible realización.

La figura 2 muestra un esquema del portamuestras de la invención, de acuerdo con una posible realización.

5 La figura 3 muestra un esquema del sistema de la invención, de acuerdo con una posible realización.

La figura 4 muestra un ejemplo de patrones de interferencia de *Speckle*, donde se puede observar el moteado interferencial producido por la luz retrodifundida por la muestra.

10 La figura 5 muestra una correspondencia entre los valores de contraste de *Speckle* obtenidos y los valores de concentración de hematíes medidos por métodos externos.

### Descripción detallada de la invención

15 En este texto, el término "comprende" y sus variantes no deben entenderse en un sentido excluyente, es decir, estos términos no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

20 Además, los términos "aproximadamente", "sustancialmente", "alrededor de", "unos", etc. deben entenderse como indicando valores próximos a los que dichos términos acompañen, ya que por errores de cálculo o de medida, resulte imposible conseguir esos valores con total exactitud.

25 Las características del sistema y método de la invención, así como las ventajas derivadas de las mismas, podrán comprenderse mejor con la siguiente descripción, hecha con referencia a los dibujos antes enumerados.

30 Las siguientes realizaciones preferidas se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

35 A continuación, se describe el sistema y método de la invención para el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor, de acuerdo con el esquema del mismo de las figuras 1 y 2. La invención está basada en medidas de contraste de *Speckle* (moteado interferencial) a través de luz retrodifundida. El dispositivo es sencillo y de bajo coste, el método de medida es rápido y no destructivo y además, el dispositivo y el método presentan la ventaja de no necesitar la extracción de muestras y su posterior eliminación.

El sistema de la invención comprende:

45 - al menos una fuente de luz 11 coherente monocromática, por ejemplo un láser, tal que dicha fuente 11 emite una luz cuya longitud de onda no sea absorbida por los componentes de la muestra a analizar. En una posible realización, la fuente de luz 11 coherente monocromática emite una luz cuya longitud de onda es de 632 nm.

50 - un portamuestras 12, 22, que comprende a su vez:

- Una superficie 13, 23 plana y horizontal que soporta el recipiente contenedor 14, 24 de la muestra en posición horizontal, con un orificio de superficie 15, 25 al menos del tamaño del haz de luz incidente que llega a dicha superficie 13, 23, tal que el haz de luz



incidente atraviese el orificio de superficie 15, 25 y no se produzca difracción en los bordes.

El recipiente contenedor 14, 24 de la muestra es no rígido, susceptible de una compresión y presenta un color transparente. Además, preferentemente, el recipiente contenedor 14, 24 es de un tamaño inferior al tamaño de la superficie 13, 23 tal que no se generen flujos internos en los extremos del recipiente contenedor 14, 24 que no reposan sobre la superficie 13, 23. En una posible realización, el recipiente contenedor 14, 24 es una bolsa de plástico.

- Un elemento de compresión 16, 26 plano y horizontal, por ejemplo una pletina, tal que la superficie 13, 23 y el elemento de compresión 16, 26 son paralelos y tal que el elemento de compresión 16, 26 se encuentra en un plano superior con respecto a la superficie 13, 23, con un orificio de elemento de compresión 17, 27 al menos del tamaño del haz de luz hacia delante proveniente de la muestra que llega a dicho elemento de compresión 16, 26, donde dicho orificio de elemento de compresión 17, 27 se encuentra alineado con el orificio de superficie 15, 25. En una posible realización, y como se muestra en la figura 2, la superficie 23 y el elemento de compresión 26 se encuentran unidos en sus extremos laterales formando una única pieza. Un experto en la materia entenderá que las dimensiones del elemento de compresión 16, 26 deben ser aquellas que permitan comprimir una parte del recipiente contenedor 14, 24 manteniendo un volumen iluminado constante. En una posible realización, el tamaño del elemento de compresión 16, 26 es inferior a 1/3 el tamaño de la superficie 13, 23, de forma que se comprime un volumen inferior a 1/3 del recipiente contenedor 14, 24.

El color de la superficie 13, 23 y del elemento de compresión 16, 26 ha de ser preferentemente negro para evitar que la luz difundida interfiera con la muestra. Además, el material ha de ser suficientemente rígido para evitar deformaciones durante el uso. Ejemplos de materiales apropiados son hierro o aluminio.

- Al menos un elemento de control 28 de la separación superficie 13, 23 -elemento de compresión 16, 26, configurado para controlar la distancia del elemento de compresión 16, 26 con respecto a la superficie 13, 23 y presionar el recipiente contenedor 14, 24 durante la realización del ensayo, de forma que el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica, de tal forma que sea posible presionar el recipiente contenedor 14, 24 en cada ensayo de igual manera, independientemente de la cantidad de muestra que contiene y de las presiones internas. En una posible realización, el sistema comprende dos elementos de control situados en el elemento de compresión a cada lado del orificio de elemento de compresión, y ambos elementos de control son topes.

Experimentalmente, los investigadores han observado que la dimensión de la superficie iluminada se relaciona con el espesor a través de la expresión:

$$e \cdot S \cdot N_p \sim 3 \cdot 10^7 \text{ partículas}$$

donde

$N_p$ : es la concentración (partículas por unidad de volumen) de la muestra iluminada.

$e$ : es la distancia del elemento de compresión 16, 26 con respecto a la superficie 13, 23 durante la realización del ensayo, o lo que es lo mismo, el espesor de la muestra iluminada durante la realización del ensayo.

S: es la dimensión de la superficie iluminada.

Por tanto, si la sección de haz de luz es SI, la distancia entre superficie 13, 23 y elemento de compresión 16, 26 durante la realización del ensayo (e) es de aproximadamente:

$$e \approx 3 \cdot 10^7 / SI / N_p$$

En este sentido, los investigadores han observado que un espesor alto (100 veces mayor que el valor de espesor óptimo) conlleva un mayor número de partículas difusoras, lo que produce un continuo en el patrón de *Speckle*. Por otro lado, los investigadores han observado que un espesor bajo (100 veces menor que el valor de espesor óptimo) conlleva que no se cumpla el efecto de superposición aleatoria. Por lo tanto, los investigadores han determinado que la distancia del elemento de compresión 16, 26 con respecto a la superficie 13, 23 durante la realización del ensayo (e) está comprendida entre los valores:

$$3 \cdot 10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3 \cdot 10^9 / SI / N_p$$

Y más preferentemente, entre los valores:

$$3 \cdot 10^6 / SI / N_p \leq e < 3 \cdot 10^8 / SI / N_p$$

- un detector 18 formado por un conjunto ordenado de píxeles (cámara) en cuya superficie la luz recibida forma un patrón de interferencia de *Speckle*, tal que el número de píxeles (resolución) esté comprendido entre 4 y 16 píxeles por grano de *Speckle*.

- un analizador 19 preferentemente apropiado para la longitud de onda emitida por la fuente de luz 11 coherente monocromática, situado entre el recipiente contenedor 14, 24 de la muestra y el detector 18 tal que la fuente de luz 11 coherente monocromática y el analizador 19 presentan polarizaciones cruzadas para evitar reflexión directa. En el caso de que la fuente de luz 11 coherente monocromática no esté polarizada el sistema comprende además un polarizador entre la fuente de luz 11 coherente monocromática y el recipiente contenedor 14, 24 de muestra y con dirección de polarización cruzada con la del analizador 19.

El haz de luz incidente, procedente de la fuente de luz 11 coherente monocromática, ilumina la muestra a través del orificio de superficie 15, 25, por ejemplo:

- directamente;

- a través de al menos una lámina semirreflejante;

- con la ayuda de al menos un espejo 40, como se muestra en la figura 3.

A continuación la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie 15, 25, que forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente, es dirigida hacia el detector 18, 38, por ejemplo:

- directamente, situado en una posición que forme un ángulo inferior a 30° con el haz incidente;

- a través de al menos una lámina semirreflejante;

- con la ayuda de al menos un espejo 40 orientado hacia el detector 18, 38, como se muestra en la figura 3.

La figura 3 muestra un esquema en el que el haz de luz procedente de la fuente de luz 31 coherente monocromática ilumina la muestra con la ayuda de un espejo 40, y la luz retrodifundida es dirigida hacia el detector 38 a través del espejo 40. No obstante, un experto en la materia entenderá que el medio por el que el haz de luz incidente ilumina la muestra no tiene porqué ser el mismo que el medio por el que el haz de luz retrodifundida es dirigida hacia el detector 18, 38. Por ejemplo, el haz de luz procedente de la fuente de luz 11, 31 coherente monocromática puede iluminar la muestra directamente y ser dirigida hacia el detector 18, 38 a través de una lámina semirreflejante.

Además, un experto en la materia entenderá que la mayor parte de la luz que llega a la muestra es dirigida hacia delante (*forwardscattering*), por lo que para que esta luz *forward* no rebote en el elemento de compresión 16, 26, 36 y contribuya al back (retrodifusión), el elemento de compresión 16, 26, 36 comprende el orificio de elemento de compresión 17, 27, 37 descrito anteriormente.

En una posible realización, y para mejorar el contraste, el sistema comprende una lente 41 situada entre el orificio de superficie 15, 25, 35 y el detector 18, 38, configurada para recoger la señal retrodifundida y concentrar la luz retrodifundida sobre la superficie del detector 18, 38. En una posible realización, esta lente 41 lleva un recubrimiento anti-reflejante para reducir rebotes en la señal a medir.

Además, en una posible realización, el sistema comprende al menos un diafragma 42 situado por ejemplo a la entrada del detector 18, 38 y que está configurado para filtrar la señal.

El método de la invención para el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor 14, 24, 34, se describe a continuación:

En primer lugar, se sitúa el recipiente contenedor 14, 24, 34 en el portamuestras 12, 22, 32.

A continuación, se ajusta la distancia del elemento de compresión 16, 26, 36 con respecto a la superficie 13, 23, 33 mediante el elemento de control 28 tal que, durante la realización del ensayo, el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica. Esta distancia del elemento de compresión 16, 26, 36 con respecto a la superficie 13, 23 33 durante la realización del ensayo (e) está comprendida entre los valores:

$$3.10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3.10^9 / SI / N_p$$

Y más preferentemente, entre los valores:

$$3.10^6 / SI / N_p \leq e < 3.10^8 / SI / N_p$$

A continuación, se deja el recipiente contenedor 14, 24, 34 en reposo (sin comenzar el ensayo) durante un tiempo de al menos 90 segundos. Un experto en la materia entenderá que el objetivo de este reposo es limitar el efecto de los flujos internos en el movimiento de las partículas de forma que todo el movimiento de estas se deba al movimiento browniano térmico. Esto implica que las muestras han de medirse siempre a una temperatura constante con un error de aproximadamente  $\pm 3^\circ$  centígrados.

El siguiente paso consiste en procesar los diferentes patrones de interferencia de *Speckle* formados en la superficie del detector 18, 38 a lo largo de una secuencia temporal, siendo 10 el número mínimo de patrones de interferencia de *Speckle* a procesar. La figura 4 muestra un ejemplo de patrones de interferencia de *Speckle*, donde se puede observar el moteado

interferencial producido por la luz retrodifundida por la muestra. El tiempo de exposición utilizado para la captura de la imagen es del orden del tiempo de coherencia del patrón, que en este caso está en torno a los 10 ms.

- 5 En una posible realización, el procesamiento de imágenes se realiza mediante un filtro gaussiano, configurado para eliminar los ruidos de detección. En otra posible realización, el procesamiento de imágenes se realiza mediante un filtro laplaciano, configurado para destacar las zonas de mayor intensidad. En otra posible, realización se utilizan ambos filtros.
- 10 A continuación, se evalúa la intensidad media de cada pixel y la desviación estándar de cada pixel; y se obtiene el contraste de cada pixel, como el cociente entre su desviación estándar y su intensidad media.  
  
A continuación, se obtiene el contraste global, realizando un promedio de los valores de  
15 contraste de cada pixel.  
  
En una posible realización, la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se  
20 evalúa a lo largo de la secuencia temporal de imágenes, y el contraste obtenido para cada pixel es temporal.  
  
Alternativamente, la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se evalúa en un  
área en torno a dicho pixel, el contraste obtenido para cada pixel es espacial, y a continuación  
se promedia a lo largo de la secuencia temporal de imágenes este contraste espacial de cada  
25 pixel, obteniendo un nuevo valor de contraste espacial para cada pixel.  
  
El método de la invención realiza al menos un calibrado del sistema a partir de datos obtenidos  
de un hemograma de un conjunto de muestras de control, estableciendo así una tabla de  
correspondencia (ejemplo: contraste global obtenido con el sistema vs concentración obtenida  
del hemograma); y a partir de la tabla de correspondencia, se obtiene el valor del componente  
30 de la muestra buscado (por ejemplo: concentración de hematíes). La figura 5 muestra una  
correspondencia entre los valores de contraste de *Speckle* obtenidos y los valores de  
concentración de hematíes medidos por métodos externos.  
  
En el proceso de degradación de los hematíes se llega a romper su superficie externa,  
35 liberándose así los hematocritos contenidos en su interior. En este caso, en el que existen al  
menos dos componentes de tamaños diferenciados en varios órdenes de magnitud, es muy  
interesante separar los efectos producidos por las partículas de gran tamaño (hematíes) de los  
correspondientes a las de menor tamaño (hematocritos). Por ello, en una posible realización el  
método de la invención comprende además una etapa de procesamiento de las imágenes de  
40 *Speckle* con el objetivo de eliminar la señal dominante debida a los componentes de mayor  
tamaño (por ejemplo: hematíes) y poder analizar la señal procedente de los componentes  
pequeños (por ejemplo: moléculas de hemoglobina). En una posible realización, este  
procesado de imágenes se realiza mediante la resta de dos imágenes de *Speckle*  
consecutivas, eliminado de esta forma la señal dominante debida a los componentes grandes  
45 como consecuencia de su lenta evolución.

## REIVINDICACIONES

1. Sistema configurado para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, mediante la técnica de contraste de *Speckle*, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor (14, 24, 34), que comprende:

- al menos una fuente de luz (11, 31) coherente monocromática, tal que dicha fuente (11, 31) emite una luz (haz de luz incidente) cuya longitud de onda no sea absorbida por los componentes de la muestra a analizar;

- un portamuestras (12, 22, 32), que comprende a su vez:

- una superficie (13, 23, 33) plana y horizontal que soporta el recipiente contenedor (14, 24, 34) de la muestra en posición horizontal, con un orificio de superficie (15, 25, 35) al menos del tamaño del haz de luz incidente que llega a dicha superficie (13, 23, 33), tal que el haz de luz incidente atraviese el orificio de superficie (15, 25, 35) y no se produzca difracción en los bordes; - un elemento de compresión (16, 26, 36) plano y horizontal, tal que la superficie (13, 23, 33) y el elemento de compresión (16, 26, 36) son paralelos y tal que el elemento de compresión (16, 26, 36) se encuentra en un plano superior con respecto a la superficie (13, 23, 33), con un orificio de elemento de compresión (17, 27, 37) al menos del tamaño del haz de luz hacia delante proveniente de la muestra que llega a dicho elemento de compresión (16, 26, 36), donde dicho orificio de elemento de compresión (17, 27, 37) se encuentra alineado con el orificio de superficie (15, 25, 35) tal que la luz difundida hacia delante no rebote en el portamuestras (12, 22, 32) y contribuya a la señal retrodifundida, y donde el elemento de compresión (16, 26, 36) está configurado para comprimir una parte del recipiente contenedor (14, 24, 34) manteniendo un volumen iluminado constante;

- al menos un elemento de control (28) de la separación superficie (13, 23, 33) - elemento de compresión (16, 26, 36); configurado para controlar la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) y presionar el recipiente contenedor (14, 24, 34) durante la realización del ensayo, de forma que el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica, de tal forma que sea posible presionar el recipiente contenedor (14, 24, 34) en cada ensayo de igual manera, independientemente de la cantidad de muestra que contienen y de las presiones internas; y tal que la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo está comprendida entre los valores:

$$3.10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3.10^9 / SI / N_p$$

donde:

$N_p$ : es la concentración (partículas por unidad de volumen) de la muestra iluminada;

$e$ : es la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo, o lo que es lo mismo, el espesor de la muestra iluminada durante la realización del ensayo;

$SI$ : es la dimensión de la superficie iluminada, o lo que es lo mismo, la sección de haz de luz;

- un detector (18, 38) formado por un conjunto ordenado de píxeles, en cuya superficie la luz recibida forma un patrón de interferencia de *Speckle*, tal que el número de píxeles esté comprendido entre 4 y 16 píxeles por grano de *Speckle*, estando dicho detector (18, 38) configurado para recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie (15, 25, 35), tal que dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente;
  - un analizador (19, 39) situado entre el recipiente contenedor (14, 24, 34) de la muestra y el detector (18, 38), tal que la fuente de luz (11, 31) coherente monocromática y el analizador (19, 39) presentan polarizaciones cruzadas para evitar reflexión directa.
2. El sistema de la reivindicación 1, donde dicha fuente de luz (11, 31) coherente monocromática es un láser que emite una luz cuya longitud de onda es de 632 nm.
3. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie (13, 23, 33) y el elemento de compresión (16, 26, 36) se encuentran unidos en sus extremos laterales formando una única pieza, y donde el tamaño del elemento de compresión (16, 26, 36) es inferior a 1/3 el tamaño de la superficie (13, 23, 33), de forma que se comprime un volumen inferior a 1/3 del recipiente contenedor (14, 24, 34).
4. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el color de la superficie (13, 23, 33) y del elemento de compresión (16, 26, 36) es negro y el material lo suficientemente rígido para evitar deformaciones durante el uso.
5. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en el caso de que la fuente de luz (11, 31) coherente monocromática no esté polarizada, comprende además un polarizador entre la fuente de luz (11, 31) coherente monocromática y el recipiente contenedor (14, 24, 34) de la muestra y con dirección de polarización cruzada con la del analizador (19, 39).
6. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un espejo (40) configurado para: 1) recoger la luz procedente de la fuente de luz (11, 31) coherente monocromática y dirigir dicha luz hacia la muestra a través del orificio de superficie (15, 25, 35); y/o 2) recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie (15, 25, 35), donde dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente, y dirigirla al detector (18, 38).
7. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una lámina semirreflejante configurada para: 1) recoger la luz procedente de la fuente de luz (11, 31) coherente monocromática y dirigir dicha luz hacia la muestra a través del orificio de superficie (15, 25, 35); y/o 2) recoger la luz retrodifundida por la muestra a través del orificio de superficie (15, 25, 35), donde dicha luz retrodifundida forma un ángulo inferior a 30° con respecto al haz incidente, y dirigirla al detector (18, 38).
8. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una lente (41) situada entre el orificio de superficie (15, 25, 35) y el detector (18, 38), configurada para recoger la señal retrodifundida por la muestra y concentrar esta luz retrodifundida sobre la superficie del detector (18, 38).
9. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un diafragma (42) situado a la entrada del detector (18, 38) y que está configurado para filtrar la señal.

10. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo está comprendida entre los valores:

$$5 \quad 3 \cdot 10^6 / SI / N_p \leq e < 3 \cdot 10^8 / SI / N_p$$

11. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento de compresión (16, 26, 36) es una pletina.

10 12. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende dos elementos de control (28) situados en el elemento de compresión (16, 26, 36) a cada lado del orificio de elemento de compresión, y tal que ambos elementos de control (28) son topes.

15 13. Método para realizar el recuento celular de los componentes de una muestra sanguínea, como por ejemplo concentrados de hematíes, plasma o concentrados de plaquetas, sin necesidad de extraer la muestra de su recipiente contenedor (14, 24, 34), utilizando el dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las etapas de:

20 - situar el recipiente contenedor (14, 24, 34) en el portamuestras (12, 22, 32);

- ajustar la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) mediante el elemento de control (28) tal que, durante la realización del ensayo, el volumen de la muestra iluminada sea siempre el mismo y con la misma configuración geométrica, tal que dicha distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo (e) está comprendida entre los valores:

$$30 \quad 3 \cdot 10^5 / SI / N_p \leq e \leq 3 \cdot 10^9 / SI / N_p$$

donde:

$N_p$ : es la concentración (partículas por unidad de volumen) de la muestra iluminada;

35 e: es la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo, o lo que es lo mismo, el espesor de la muestra iluminada durante la realización del ensayo;

40 SI: es la dimensión de la superficie iluminada, o lo que es lo mismo, la sección de haz de luz;

- dejar el recipiente contenedor (14, 24, 34) en reposo (sin comenzar el ensayo) durante un tiempo de al menos 90 segundos, con el objetivo de limitar el efecto de los flujos internos en el movimiento de las partículas de forma que todo el movimiento de estas se deba al movimiento browniano térmico;

45 - procesar los diferentes patrones de interferencia de *Speckle* formados en la superficie del detector (18, 38) a lo largo de una secuencia temporal, siendo 10 el número mínimo de patrones de interferencia de *Speckle* a procesar y siendo el tiempo de exposición utilizado para la captura de la imagen del orden del tiempo de coherencia del patrón;

50 - evaluar la intensidad media de cada pixel y la desviación estándar de cada pixel;

- obtener el contraste de cada pixel, como el cociente entre su desviación estándar y su intensidad media;
- 5        - obtener el contraste global, realizando un promedio de los valores de contraste de cada pixel;
- 10       - realizar al menos un calibrado del sistema a partir de datos obtenidos de un hemograma de un conjunto de muestras de control, estableciendo así una tabla de correspondencia (ejemplo: contraste global obtenido con el sistema vs concentración obtenida del hemograma);
- a partir de la tabla de correspondencia, obtener el valor del componente de la muestra buscado (por ejemplo: concentración de hematíes).
- 15    14. El método de la reivindicación anterior, donde la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se evalúa a lo largo de la secuencia temporal de imágenes, y donde el contraste obtenido para cada pixel es temporal.
- 20    15. El método de la reivindicación 13, donde la intensidad media y la desviación estándar de cada pixel se evalúa en un área en torno a dicho pixel, donde el contraste obtenido para cada pixel es espacial, y donde a continuación se promedia a lo largo de la secuencia temporal de imágenes este contraste espacial de cada pixel, obteniendo un nuevo valor de contraste espacial para cada pixel.
- 25    16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde el procesado de imágenes se realiza mediante un filtro gaussiano, configurado para eliminar los ruidos de detección.
- 30    17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde el procesado de imágenes se realiza mediante un filtro laplaciano, configurado para destacar las zonas de mayor intensidad.
- 35    18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde en el caso en el que existan al menos dos componentes de tamaños diferenciados en varios órdenes de magnitud comprende además una etapa de procesado de las imágenes de *Speckle* con el objetivo de eliminar la señal dominante debida a los componentes de mayor tamaño (por ejemplo: hematíes) y poder analizar la señal procedente de los componentes de menor tamaño (por ejemplo: moléculas de hemoglobina).
- 40    19. El método de la reivindicación anterior donde el procesado de imágenes se realiza mediante la resta de dos imágenes de *Speckle* consecutivas, eliminando de esta forma la señal dominante debida a los componentes de mayor tamaño como consecuencia de su lenta evolución.
- 45    20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, donde la distancia del elemento de compresión (16, 26, 36) con respecto a la superficie (13, 23, 33) durante la realización del ensayo (e) está comprendida entre los valores:  

$$3 \cdot 10^6 / SI / N_p \leq e < 3 \cdot 10^8 / SI / N_p$$
- 50    21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, donde el tiempo de exposición utilizado para la captura de la imagen es de aproximadamente 10 ms.



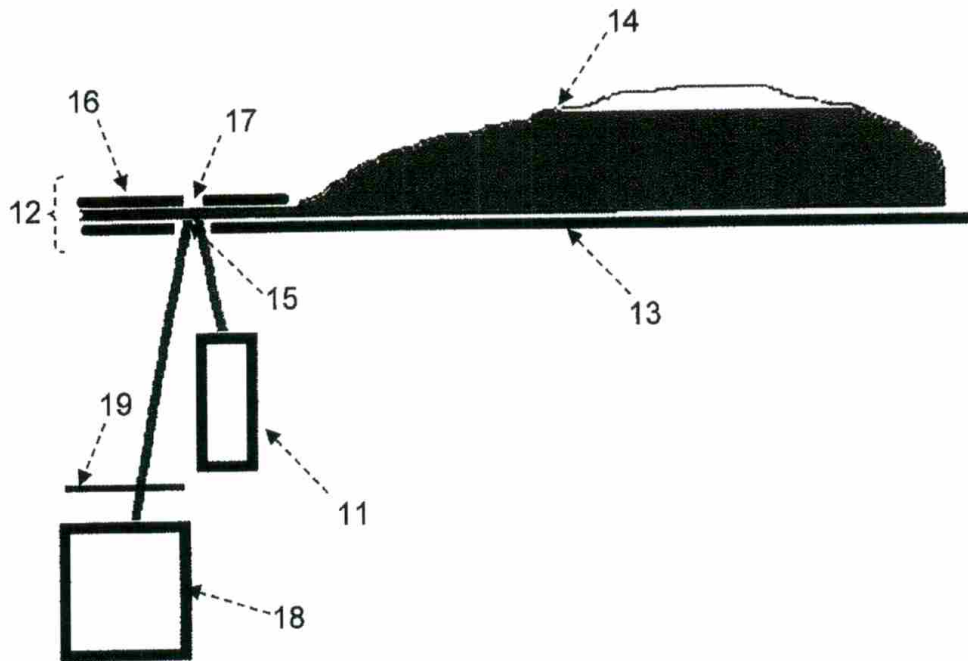


FIGURA 1

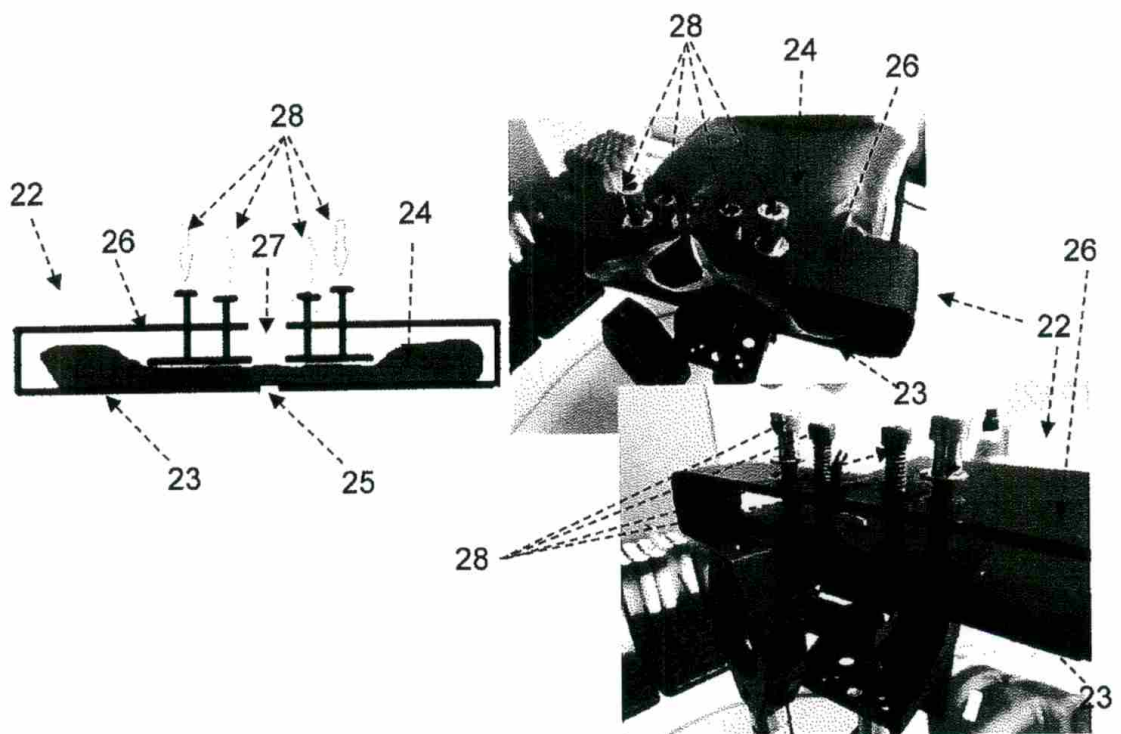


FIGURA 2

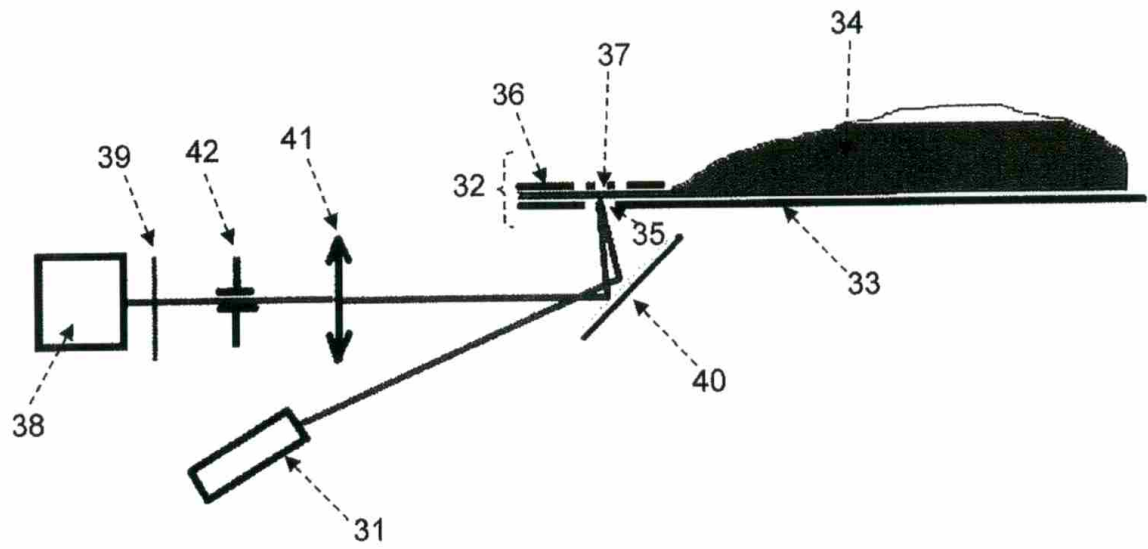


FIGURA 3

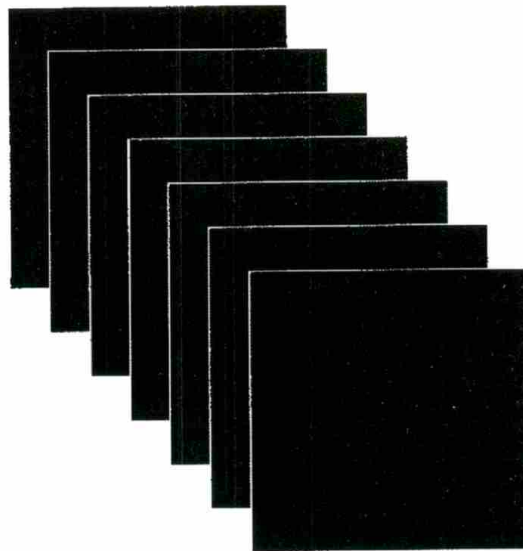


FIGURA 4

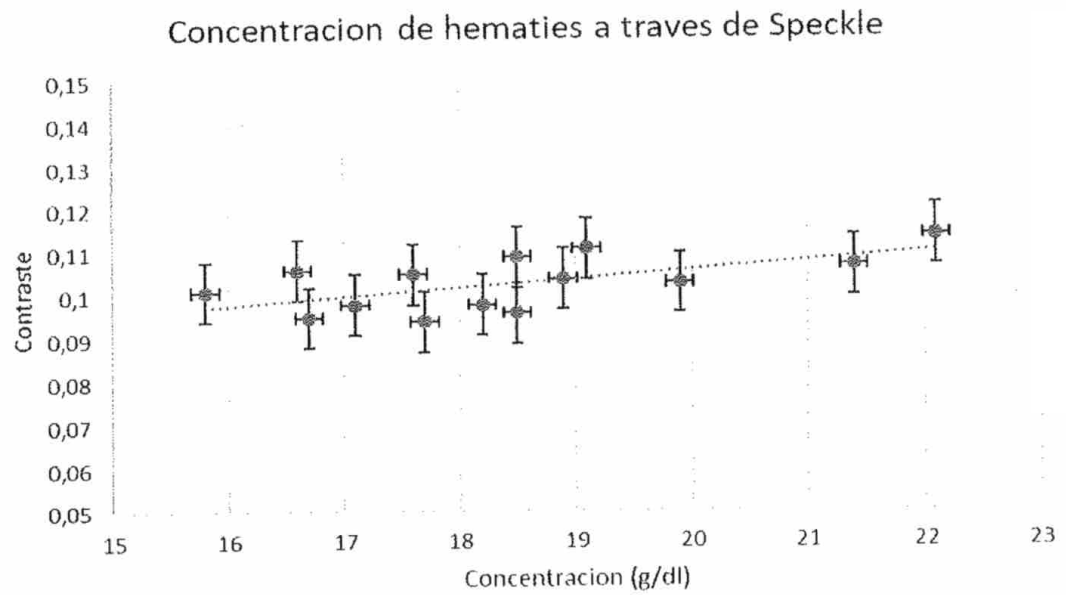


FIGURA 5